



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**POVRCHOVÉ ÚPRAVY MATERIÁLŮ PRO
BIOTECHNOLÓGIE**

SURFACE TREATMENT OF MATERIALS FOR BIOTECHNOLOGIES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Marek Šupák

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. František Krčma, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1185/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Marek Šupák**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. RNDr. František Krčma, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Povrchové úpravy materiálů pro biotechnologie

Zadání bakalářské práce:

Bakalářská práce se zaměřuje na problematiku využití nízkoteplotního nerovnovážného plazmatu elektrických výbojů pro povrchové úpravy materiálů pro biotechnologické aplikace. Jednotlivé úkoly jsou následující:

1. Prostudujte současný stav aplikací nízkoteplotního plazmatu pro povrchové úpravy materiálů.
2. Aplikujte plazma na vybraný materiál.
3. Charakterizujte změny povrchových vlastností materiálu v závislosti na experimentálních podmínkách.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Marek Šupák
student(ka)

doc. RNDr. František Krčma, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Teoretická časť je zameraná na význam kvasiniek, ich role v pivovarníctve, a potreby spoľahlivého a ekonomicky výhodného pasterizačného kroku, ktorý by spĺňal moderné požiadavky. Rovnako je v tejto časti definovaná plazma, jej výskyt a použitie pre povrchové úpravy skla použitého v praktickej časti.

Bakalárska práca sa v prvej časti experimentálnej práce zaoberá účinkom plazmy ako prostriedku na pasterizáciu. Do plazmatického výboja boli vložené kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Postupne bola menená doba expozície kvasiniek v plazmatickom výboji a sledované množstvo živých a mŕtvych buniek. Na identifikáciu životaschopnosti kvasiniek bolo použité farbivo metylénová modrá. Po zafarbení boli kvasinky sledované pod mikroskopom a spočítané. Na určenie počtu kvasiniek bola použitá Bürkerova komôrka. Experimentom bola preukázaná účinnosť plazmy ako sterilizačného kroku, vzhľadom na znižujúci sa počet živých buniek a zvyšujúci sa počet v mŕtvych buniek vo vzorke s obsahom kvasiniek.

V druhej časti bol povrch skla aktivovaný v plazmatickom výboji. Takto pripravené sklo bolo ponorené do kultivačného média po dobu 24 hodín do vytvorenia vrstvy kultivačného média na povrchu skla. Potom boli odstránené zvyšky kultivačného média a na povrch bolo napipetované malé množstvo kvasiniek v destilačnej vode. Po 24 hodinách boli kvasinky počítané na Bürkerovej komôrke, zhodnotený prírastok počtu kvasiniek a vyhodnotený účinok plazmatického výboja na aktiváciu a vytvorenie vrstvy. Na potvrdenie účinku plazmy na povrch skla bola použitá metóda kontaktných uhlov. V tejto časti sme dokázali vplyv účinku plazmy na povrch skla i tvorbu tenkej vrstvy živného média, ktorá zásobovala kvasinky potrebnými látkami pre rozmnožovanie.

Kľúčové slová:

plazma, *Saccharomyces cerevisiae*, pasterizácia, kontaktné uhly, povrch skla, kvasinky

Abstract

The theoretical part focuses on the importance of yeast, its role in brewing, the need for a reliable and economically beneficial pasteurization step that would meet modern requirements. Also in this part is defined plasma, its occurrence and the use of the glass structure used in the practical part.

In the first part of the experimental work, the bachelor thesis deals with the action of plasma as a means of pasteurization. *Saccharomyces cerevisiae* yeast was introduced into the plasma. Gradually, the period of exposure of the yeast to the plasma discharge was determined and the number of survived and dead cells monitored. The methylene blue dye was used to identify yeast viability. After staining, the yeast was monitored under a microscope and calculated. Bürker's cell was used to determine the number of yeast cells. The experiment demonstrated plasma activity as a sterilization step, due to the decreasing number of living cells and the increase in the number of dead cells in the yeast-containing sample.

In the 2nd part the surface was activated in the plasma discharge. The glass thus prepared was immersed in the culture medium for 24 hours to form a layer of culture medium on the surface of the glass. The remainders of the culture medium were then discharged and a small amount of yeast in the distilled water was pipetted. After 24 hours the yeast was counted on the Bürker's cell, the yeast growth was evaluated and the plasma activation efficiency was evaluated for activation and layer formation. The method of contact angles was used to confirm the effect of plasma on the surface of the glass. In this section, we demonstrated the effect of plasma on the surface of the glass and the formation of a thin layer of nutrient medium that supplied the yeast with the necessary substances for reproduction.

Key words:

plasma, *Saccharomyces cerevisiae*, pasteurization, contact angles, glass surface, yeast

ŠUPÁK, M. *Povrchové úpravy materiálov pre biotechnológie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 41 s. Vedúci bakalárskej práce doc. RNDr. František Krčma, Ph.D.

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje sú riadne uvedené v zozname použitých zdrojov s správne odcitované. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá na komerčné účely len s povolením vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

PodĎakovanie

Rád by som poďakoval vedúcemu bakalárskej práce za ochotu, prístup a poskytnutie rád potrebných na vypracovanie práce. Ďalej by som rád poďakoval Ing. Eve Vítovej, Ph.D. a Radke Novákovej z laboratórií mikrobiológie za pomoc a požičanie pomôcok na experimentálnu časť. Nakoniec by som rád poďakoval svojej rodine za podporu počas celého môjho štúdia.

Obsah

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ.....	9
2.1	Výroba piva s využitím kvasiniek druhu <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	9
2.2	Charakterizácia kvasiniek.....	11
2.3	Kvasinky rodu <i>Saccharomyces</i>	12
2.4	Vplyv teploty na kvasinky	12
2.5	Príprava živných médií	13
2.6	Živné média	14
2.7	Charakterizácia, výskyt a použitie plazmatického výboja.....	17
2.8	Sklo.....	20
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	22
3.1	Príprava kultivačného média	22
3.2	1. časť – plazma ako pasterizačný krok.....	22
3.3	2. časť – úprava povrchu skla.....	25
4	Výsledky a diskusia.....	28
4.1	1. časť experimentálnej práce - pasterizácia.....	28
4.2	2. časť experimentálnej práce – aktivácia povrchu skla, vytvorenie filmu a meranie kontaktných uhlov	33
5	ZÁVER.....	36
6	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	37
7.	ZOZNAM OBRÁZKOV.....	38
8.	ZOZNAM TABULIEK.....	39
9.	CITOVANÁ LITERATÚRA.....	40

1 ÚVOD

Plazmu môžeme charakterizovať ako kvázi neutrálny plyn nabitých a neutrálnych častíc, vykazujúcich kolektívne chovanie [1]. Tento plyn je v dnešnej dobe novinkou a v technológiach je málo využívaný aj preto, že vlastnosti plazmy nie sú celkom preskúmané. Pre túto bakalársku prácu sú podstatné 3 vlastnosti plazmy: sterilizačný charakter tohto plynu, ďalšia významná vlastnosť je, že látka vložená do plazmatického výboja sa zahrieva len minimálne, čo sme sledovali aj počas pokusu a nakoniec schopnosť aktivácie povrchu materiálu, v našom prípade sa jedná o sklo.

Sterilizácia, v našom prípade sa jedná o jej jemnejšiu formu – pasterizáciu, je tepelné ošetrenie potravin pri použití teploty do 100 °C [2]. Používa sa na inaktiváciu vegetatívnych foriem mikroorganizmov. Hoci sú tieto metódy, sterilizácia i pasterizácia, finančne pomerne náročné – treba rôzne doskové tepelné výmenníky, sú tieto metódy vďaka svojej jednoduchosti používané skoro vo všetkých odvetviach potravinárskej výroby. Tieto metódy majú veľa nežiadúcich účinkov na výsledný charakter potravin, ktorá sa takto opracuje. Predovšetkým sa jedná o zmenu senzorických a chuťových vlastností a v malej miere aj zmena nutričných vlastností. Práve tieto parametre udávajú celkovú hodnotu produktu. Tieto nedostatky vedú k postupnému skúmaniu nových možností pasterizácie. Medzi najnovšie metódy pasterizácie je možnosť použitia plazmatického výboja. Tento postup je z hľadiska teploty úplne neškodný, keďže zvýšenie teploty je pri použití plazmy minimálne, čo by malo minimalizovať stratu požadovaných vlastností. Predovšetkým sa zachovávajú dôležité prvky ako vitamíny, ktoré sú citlivé na zmeny teploty, a bielkoviny. Tým by sme mohli výrobok pasterizovaný touto metódou považovať za nutrične bohatší a tým priaznivejší na konzumáciu a rovnako lepší pre celkové zdravie človeka. Medzi produkty vystavované pasterizačnému kroku môžeme považovať pivo, ktoré vďaka svojim nutričným hodnotám prichádza týmto krokom o malé, a predsa nezanedbateľné množstvo výživovo významných látok. Tieto látky sa po zahriatí strácajú a tým znižujú kvalitu výsledného produktu. Rovnako môžeme spomenúť dopad filtrácie piva na chuťové vlastnosti koncového produktu. Tou sa odfiltrujú zložky bohaté na rôzne vitamíny a iné senzoricky aktívne zložky. Potreba nahradenia filtrácie a pasterizácie je preto v tejto dobe nevyhnutné a ako jedna z ideálnych náhrad sa javí možnosť použitia už zmieneného plazmatického výboja.

Pri kultivácii kvasiniek sa používajú rôzne kultivačné médiá v závislosti na druhu kvasiniek. Tieto kultivačné médiá musia byť sterilne pripravené a umiestnené do prostredia, kde by sa nemohli kontaminovať. Ako sterilizačný krok sa používa najčastejšie autokláv, ktorý vyžaduje školenú obsluhu schopnú obsluhovať tento typ zariadenia. Tieto parametre poukazujú na to, že vhodnou alternatívou by bolo vytvorenie ľahko prenositeľného kultivačného média, najlepšie v tuhej forme, schopné dodať kvasinkám všetky živiny potrebné pre rast a rozmnožovanie. Jednou z alternatív sa ukazuje možnosť použitia plazmatického výboja na aktiváciu povrchu skla a vytvorenie tenkého filmu, obsahujúceho všetky potrebné živiny pre rast a rozmnožovanie určitého druhu kvasiniek. Takto upravené sklíčka, spolu s vrstvičkou živín sterilne zabalené do vhodného obalu, by boli jednoduchou a nenáročnou možnosťou kultivácie, pričom by stačilo na povrch naniesť malé množstvo kvasiniek v destilovanej (najlepšie i sterilnej) vode.

Cieľom tejto bakalárskej práce je štúdium pôsobenia plazmatického výboja na kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae* v závislosti na čase, ktorý v tomto výboji strávili. Časový interval

bol stanovený na 10 sekúnd a najdlhšia doba pobytu kvasiniek v plazmatickom výboji bol 100 sekúnd, ktorý sme stanovili ako hranicu, kde množstvo kvasiniek kleslo pod hranicu možnosti sledovania. Ako pomôcku pri počítaní množstva živých a mŕtvych kvasiniek bola použitá Bürkerova komôrka. Pred počítaním boli kvasinky zafarbené farbivom metylénovou modrou, bežne používanou pre tieto účely. Jednotlivé počty boli stanovené pomocou mikroskopu určeného pre mikrobiálne potreby so zväčšením 40x bez použitia imerzného oleja. Z tohto boli vyhodnotené možnosti plazmatického výboja ako pasterizačného kroku nahradzujúci pasterizáciu zahrievaním.

V druhej časti experimentálnej práce bolo sklíčko očistené, manuálne i ultrazvukom, a bolo aktivované v plazmatickom výboji. Potom bolo sklíčko sterilne prenesené do Petriho misky a ponorené do kultivačného média pre vytvorenie tenkého filmu na povrchu. Po 24 hodinách bol zbytok kultivačného média odliati z Petriho misiek a na sklíčko bolo sterilne napipetované malé množstvo kvasiniek v destilovanej vode. Množstvo kvasiniek v destilovanej vode bolo zmerané pomocou Bürkerovej komôrky. Následne bola Petriho miska ponechaná pri izbovej teplote kultivácii a po 24 hodinách bola opäť zmerané množstvo kvasiniek odobraním malého množstva vody z povrchu sklíčka. Úspešnosti použitia plazmatického výboja na vytvorenie filmu bolo vyhodnotené na základe prírastku kvasiniek za uplynutú dobu vzhľadom na to, že kvasinky využívali len tie živiny, ktoré boli naviazané na sklíčko. Popritom bolo sledovaná zmena počtu kvasiniek v závislosti na dĺžke vystavenia v plazmatickom výboji. Sklíčko bolo v plazmatickom výboji umiestnené po dobu 1-3 minúty po kroku 1 minúta pre každý časový interval bolo spravených 5 vzoriek. Na potvrdenie účinnosti plazmatického výboja na povrch skla bola použitá metóda kontaktných uhlov, kde sa sledovala zmena hydrofilných vlastností povrchu skla v závislosti na dobe pobytu v plazmatickom výboji a efekt starnutia.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

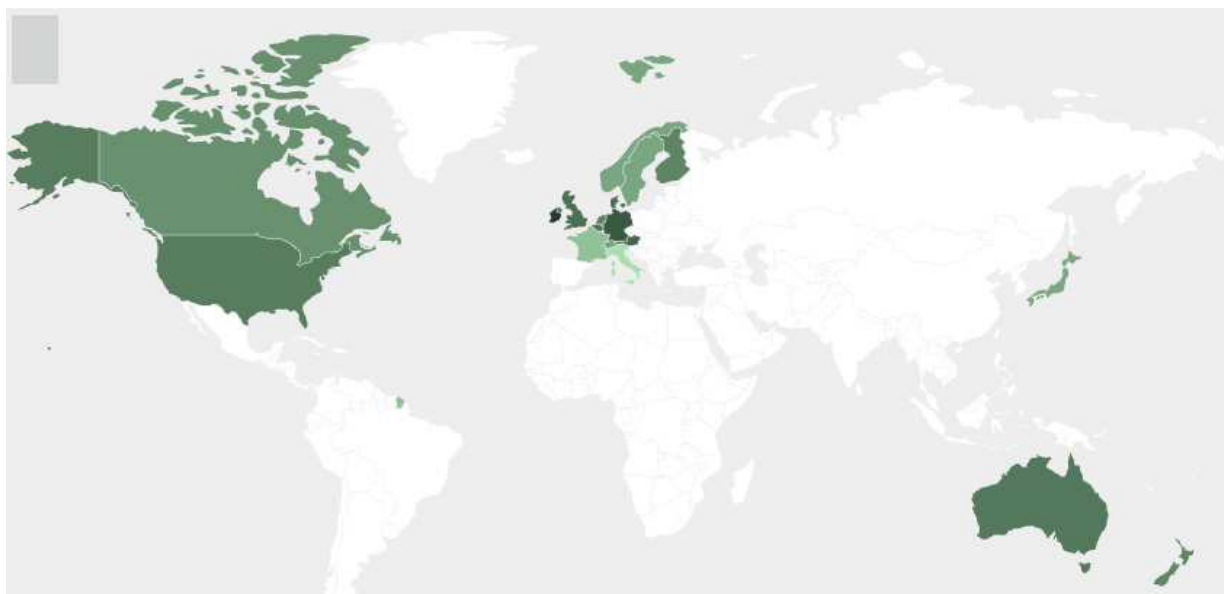
2.1 Výroba piva s využitím kvasiniek druhu *Sacharomyces cerevisiae*

2.1.1. História výroby piva

Prvá výroba piva bola potvrdená na obdobie približne 3500 rokov pred naším letopočtom. V oblasti dnešného západného Iránu bola objavená hlinená nádoba obsahujúca oxalát vápenatý (CaC_2O_4), ktorý je práve jeden znakov pivnej produkcie [3]. Následne môžeme sledovať históriu piva počas celých dejín vývoja starovekých spoločností. Od Sumerov a Mezopotámii až po Egypt. Objavená bola hlinená tabuľka, ktorej vek sa odhaduje približne na 2600 rokov, obsahujúca termíny spájané s výrobou piva [3]. V Európe bola výroba piva zaznamenaná až v období približne 2000-1500 rokov pred naším letopočtom [3]. Vzhľadom na polohu výskytu piva v Európe bolo potvrdené, že objavenie výroby piva bolo nezávislé od civilizácii, ktoré túto výrobu už poznali. S pribúdajúcimi skúsenosťami a modernejšími technológiami sa výroba piva rozrástla po celej Európe. A hoci narastali skúsenosti s výrobou piva, tak stále nebolo jasné, ako celý proces funguje. Až v roku 1857, Louis Pasteur, zistil, že kvasenie je druh látkovej premeny živých organizmov, kde sa rozkladajú jednoduché sacharidy na alkohol a oxid uhličitý [4]. Výroba piva sa nezávisle na tomto poznatku vyvíjala po celé tisícročia. Jednotlivé kroky výroby boli zaznamenávané a vylepšované.

2.1.2. Súčasné postavenie piva

Pivo je v súčasnosti najpredávanejším alkoholickým nápojom v Európe a jeho význam sa nestráca ani za hranicami Európy. Medzi najväčších konzumentov piva patria národy strednej Európy, Austrália, USA, Kanada a Fínsko. Na obrázku 1 môžeme vidieť farebne označené jednotlivé krajiny. Tmavo-zelenú reprezentujú národy s vysokou konzumáciou piva na jedného obyvateľa za obdobie jedného roku. Jedná sa o krajiny Nemecko, Rakúsko, Írsko a Česká republika so spotrebou 163,5 litra na osobu na rok [5]. V týchto krajinách je konzumácia piva spojená taktiež s kultúrno-spoločenskou stránkou života. Ostatné krajiny označené zelenou farbou dosahujú v prieskume nižšiu konzumáciu piva na osobu za rok, ale rovnako prispievajú značnou mierou do celkovej spotreby piva. Krajiny označené bielou farbou prispievajú len minimálnou mierou do celkovej hodnoty konzumácie piva, ale ani tu nemôžeme vylúčiť pivo ako jeden z vedľajších nápojov vyskytujúc sa na trhu. Z tohto prieskumu môžeme vyniesť argument, že pivo je jedným zo základných nápojov, ktorý sa konzumuje po celom svete.



Obrázok 1: Mapa spotreby piva [6]

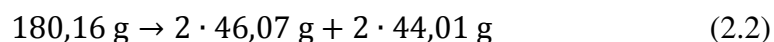
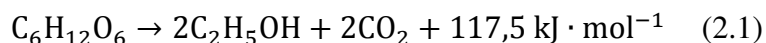
2.1.3. Delenie piva podľa použitého sladú a pasterizácia

Rozoznávame 2 základné druhy piva podľa použitého sladú. Svetlé pivo (plzenské) a tmavé pivo (bavorské) [4]. Kombináciou následne vznikajú polotmavé alebo polosvetlé pivá. Tie sa rozlišujú rôznym pomerom obsahu svetlého a tmavého piva. Trvanlivejšie sú fľaškové pivá, ktoré sú často pasterizované. Na pasterizáciu sa výhradne používa zahrievanie v obaloch i bez obalu. Pivo býva znehodnotený týmto zahrievaním. Teplota zahrievania musí dosiahnuť 70 °C pri prietokovej pasterizácii a 62,5 °C po dobu 20 minút pri tunelovej pasterizácii [7]. Pasterizované pivo býva preto často ochudobnené o významné chuťové i senzorické látky. Toto ochudobnenie by malo odrádzať výrobcov piva od tepelného opracovania piva. Keďže sa jedná o najspôľahlivejší a pomerne jednoduchý postup ako značne predĺžiť životnosť a kvalitu piva je stále využívaný po celom svete. Stále existuje zopár výrobcov, ktoré vyrábajú tzv. tankové pivo. Toto pivo sa filtruje, ale vynecháva sa krok pasterizácie. Keďže sa pivo opätovne nezahrieva, tak vyniká svojimi chuťovými vlastnosťami. Na úkor lepšej chuti sa značne mení trvanlivosť takého piva. Trvanlivosť tankového piva sa pohybuje v rozmedzí hodín až dní a to pri dodržaní prísnych podmienok ako sú izolácia od okolitého prostredia a chladenie na minimálne teploty.

2.1.4. Kvasenie v pivovarníctve

Medzi najdôležitejšie procesy v pivovarníctve môžeme bezpochyby zahrnúť proces kvasenia. Tento krok musí byť sprevádzaný rôznymi bezpečnostnými opatreniami z hľadiska možnej kontaminácie produktu. Medzi organizmy žiadané zahrňujeme kvasinky, ktoré sú pôvodcami alkoholového, alebo taktiež nazývaného etanolového, kvasenia. Sú to najmä kvasinky rodov *Saccharomyces* a *Torula* [8]. Vo väčšine potravinárskych technológií sa používajú výhradne kvasinky typu *Saccharomyces*, ktoré sú okrem pivovarníctva hojne využívané aj vo vinárstve, liehovarníctve a pekárstve [2]. Tieto kvasinky sa delia na kultúrne (vo väčšine prípadov *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsodeus*) a divoké (napríklad druhy rodu *Saccharomyces pastorianus*). Ich najväčšia odlišnosť je hlavne v kvasivej mohutnosti, ktorá je charakterizovaná ako schopnosť prekvasovať koncentrovanejšie cukornaté roztoky až na nepatrné zvyšky cukru označovanej ako zvyškový cukor [2].

Výtťažnosť etanolového kvasenia je charakterizovaná Gay-Lussacovou rovnicou (2.1), ktorá udáva, z akého množstva glukózy dostaneme požadované množstvo etanolu [8]. Ako vedľajší produkt pritom vzniká oxid uhličitý a teplo. Oba tieto vedľajšie produkty sú významné činitele pri výrobe piva. Zmes sa musí neustále chlaďiť, aby vzniknuté teplo nenarušovalo priebeh kvasného procesu. Oxid uhličitý sa musí neustále odvádzať, aby nedošlo k nadmernému nahromadeniu plynov v kvasnej nádobe. Taktiež je indikátorom etanolového kvasenia. Po skončení vyvíjania oxidu uhličitého je proces kvasenia ukončený a prebiehajú ďalšie procesy ako napríklad filtrácia a sterilizácia.



V rovnici (2.2) je uvedené celkové množstvo glukózy ako majoritného produktu etanolového kvasenia potrebného na vyrobenie 92,14 g etanolu. V praxi sa stretneme asi s 90 % výtťažnosťou, ktorá je uvedená v tejto rovnici [8]. Tento proces získavania etanolu je pomerne zložitý a prebieha v reťazci viazanom na fosforylačný mechanizmus [9].

2.2 Charakterizácia kvasiniek

Kvasinky sú eukaryotické mikroorganizmy, ktoré zaradujeme medzi huby (*Fungi*) [8]. Svoje pomenovanie dostali na základe ich schopnosti zkvašovať monosacharidy, niektoré disacharidy, prípadne i trisacharidy na konečné produkty, ktoré sú etanol a oxid uhličitý za vývinu tepla [8]. To sa hojne využíva pri fermentačných technológiách pri výrobe etanolu a ďalších potravinársky významných produktov [7].

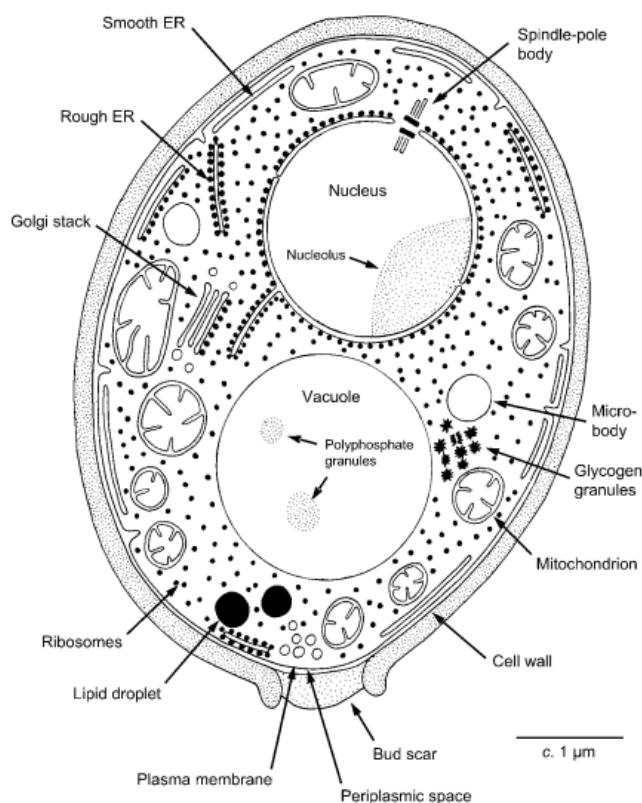
Tvar kvasiniek zodpovedá spôsobu ich rozmnožovania. Rozmnožovanie kvasiniek prebieha vegetatívne, pučaním alebo delením, alebo pohlavne pomocou pohlavných spór. Pri pučaní vzniká malá dcérina bunka nazývaná pupen, ktorá je spojená kanálikom s materskou bunkou [8]. Po uzavretí kanáliku sa syntetizuje bunková stena a po ukončení syntézy sa oddeľuje dcérina bunka ako samostatný celok. Pohlavné rozmnožovanie je obecné charakterizované ako spájanie dvoch haploidných buniek, ktoré sa nazýva konjugácia alebo kopulácia, sprevádzané spájaním ich jadier za vzniku diploidného jadra [8]. Toto jadro sa následne delí mitoticky na 4 haploidné bunky meiózou (redukčným delením). Tieto haploidné bunky sú následne základom pohlavných spór.

Bunková hmota kvasiniek je pomerne bohatá na vodu. Obsahuje približne 65-83 % vody [8]. Tento vysoký rozsah je spôsobený rozdielnymi rodmi kvasiniek a ich životnými potrebami a prostredím, v ktorom sa bežne vyskytujú. Hlavný podiel sušiny následne tvoria bielkoviny (cca 50 %), glykogén (až 30 %) a ďalšie látky, ako sú nukleové kyseliny, štruktúrne polysacharidy a popol. Z organických látok sú to prevažne vitamíny skupiny B, v najväčšom množstve vitamíny B₁, B₂ a B₆, provitamín D a provitamín A. Na vitamíny B sú veľmi bohaté najmä pivovárenské kvasnice, ktoré ich odčerpávajú z mladiny. V mladine je hlavnou surovinou slad, ktorý je práve bohatý na tieto vitamíny [7].

Kvasinky pre svoj rast využívajú vzdušný kyslík. Túto vlastnosť majú podobnú s plesňami. Hlavný rozdiel je ale schopnosť kvasiniek metabolizovať aj za anaeróbných podmienok – fermentačný metabolizmus. Toto je významné hlavne z toho dôvodu, že hoci rast bunkovej hmoty je veľmi obmedzený, sú schopné produkovať etanol a oxid uhličitý [8]. Pre potravinársku prax je podstatne významných asi 22 rodov a k nim prislúchajúce druhy.

2.3 Kvasinky rodu *Saccharomyces*

Medzi technologicky najvýznamnejšie sú v súčasnosti považované kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Vo všeobecnosti je označovaná ako pивná, vínná, liehovarnícka a pekárenská kvasinka [2]. Tieto kvasinky sú schopné skvašovať veľké množstvo cukrov, pričom nevyužívajú laktózu ako zdroj uhlíka a dusičnany ako zdroj dusíka [9]. Medzi cukry, ktoré sú schopné fermentovať zahrňujeme glukózu, fruktózu, sacharózu, maltózu a rafinózu [10]. Tvar buniek je oválny so zreteľne ohraničenou vakuolou. Bežné rozmery tohto druhu kvasiniek sú 6 až 7 × 7,5 až 8,5 μm [7]. Bunková stena kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* je tvorená 3 vrstvami nezávislými od seba. U tohto rodu je na vnútornej vrstve steny – vrstva susediaca s cytoplazmatickou membránou, zložená z glukanu a bielkovín, ďalej nasleduje glukomannan s bielkovinami a na povrchu sa nachádzajú mannany s bielkovinami a malým množstvom lipidov [8]. Po ukončení kvasenia klesá množstvo mannanov a stúpa množstvo bielkovín. To zapríčiňuje technologicky významný krok – flokuláciu kvasiniek [8]. Kvasinky postupne flokulujú – sedimentujú, na dno, kde sa odčerpávajú na ďalšie použitie. Druh *Saccharomyces cerevisiae* sa rozmnožujú pučaním.



Obrázok 2: Tvar a zloženie kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Vacuole -vakuola, nucleus -jadro, golgi stack -golgiho aparát, mitochondrion - mitochondria, cell-wall - bunková stena, smooth ER -hladké endoplazmatické retikulum, rough ER - drsné endoplazmatické retikulum, ribosomes - ribozómy, periplasmic space - medzimembránový priestor, lipid droplet - tukové kvapky, plasma membrane - plazmatická membrána [11].

2.4 Vplyv teploty na kvasinky

Ako môžeme vidieť v tabuľke 1, prostredie, v ktorom sa môžu rozmnožovať alebo metabolizovať, musí mať prijateľnú teplotu v rozmedzí ich schopnosti prežitia. Tieto rozmedzia, uvedené VTA, sú veľmi rozdielne. Na ich základe sa rozdeľujú mikroorganizmy do štyroch základných kategórii: psychrofilné, psychrotrofné, mezofilné a termofilné [10]. Aj keď ich optimálna teplota prežitia je pomerne rozdielna, svojou maximálnou alebo

minimálnou teplotou môžu zasahovať do iných kategórii. Preto môžeme v niektorých prípadoch vidieť popri sebe mezofilné a psychrotrofné mikroorganizmy.

Tabuľka 1: Delenie mikroorganizmov na základe teploty prežitia [10]

Skupina	Teplota (°C)		
	minimálna	optimálna	maximálna
Psychrofilné	-5 až 5	12 až 15	15 až 20
Psychrotrofné	-5 až 5	25 až 30	30 až 35
Mezofilné	5 až 15	30 až 40	35 až 47
Termofilné	40 až 45	55 až 75	60 až 90

Hoci sú tieto teplotné rozmedzia široké, môžu kolísať v závislosti od prostredia. Faktory ovplyvňujúce rast a vývoj sú taktiež redoxný potenciál, pH prostredia či aktivita vody [12].

2.5 Príprava živných médií

Veľmi dôležité je kultivovať mikroorganizmy na sterilných živných pôdach. Dôležitými faktormi na kultiváciu sú nároky na výživu, pH, dostatočná vlhkosť, vhodná teplota, aeróbne či anaeróbne podmienky, rôzne rastové faktory či osmotické pomery. Rovnako dôležité je i získanie väčšieho množstva bunečnej hmoty [13].

Čím viac sa bude podobat' zloženie kultivačného média prirodzeným podmienkam mikroorganizmu, tým lepšie sa bude tento mikroorganizmus rozmnožovať v laboratórnych podmienkach, ktoré si zvolíme.

U každého mikroorganizmu môžeme vidieť rôzne požiadavky. Niektoré mikroorganizmy požadujú jednoduché anorganické látky, ale niektoré organotrofné baktérie vyžadujú zložitejšie organické látky (napr. vitamíny).

K udržiavaniu populácie (kolónie) mikroorganizmov je nutné zistiť presné podmienky, pri ktorých ich možno rozmnožovať – vytvoriť tzv. ideálne prostredie a následne ich uchovať za podmienok, kedy odumierajú najpomalšie. Rovnako dôležité je i získanie väčšieho množstva bunečnej hmoty [14].



Obrázok 3: Univerzálne živné médium-agar [15]

2.6 Živné média

Živné média sú následne delené do rôznych kategórii podľa pôvodu, skupenstva či použitia.

Delenie živných médií podľa pôvodu a prípravy:

- prirodzené
- synteticko-komplexné (polosyntetické) – okrem chemicky definovaných zlúčenín obsahuje i rôzne výluhy a odvary niektorých prírodných zlúčenín ako zdroj vitamínov a aminokyselín (napr. krv alebo mäsová voda)
- syntetické – presne chemicky definované látky. Je to zmes organických i anorganických zlúčenín. Bežne sa používajú na študijné účely. Preferujú ho striktne litofilné baktérie.

Delenie živných médií podľa použitia:

- univerzálne – svojím zložením umožňujú kultiváciu širokého spektra mikroorganizmov. Môže to byť napríklad agar (uvedený na obrázku 3), mäsopeptidový bujón alebo sladina pre kvasinky [14].
- selektívne – zloženie umožňuje rast iba jedného druhu alebo skupiny mikroorganizmov. Ostatné mikroorganizmy sú daným zložením inhibované prípadne sú plne potlačované. Medzi látky inhibujúce ostatné mikroorganizmy patria napríklad farbivá, antibiotiká, žľčové soli či azid sodný. Medzi selektívne živné média patria Ashbyho agar alebo agar s 10% NaCl [16].
- selektívne diagnostické – na týchto médiách rastie len malá skupinka mikroorganizmov. Prejavuje sa konkrétnou biochemickou reakciou charakteristickou pre daný mikroorganizmus. Do tohto typu média spadá napríklad Endova pôda vhodná na kultiváciu baktérie *Escherichia coli* [16].
- pomnožovacie – vhodné na množenie malého množstva mikroorganizmov.
- transportné – využívané v klinickej mikrobiológii. V praxi sa využíva na zistenie prežitia behom transportu [9].

2.6.1. Príprava kultivačných médií

Väčšina mikroorganizmov požaduje neutrálne prostredie, ale sú i výnimky. Medzi ne patria napr.: kvasinky a mikromycéty, ktoré požadujú pH v rozmedzí 4,5-6. Toto pH sa upravuje v studenom médiu pred sterilizáciou. Ako kontrolu môžeme použiť pH papieriky (ak požaduje vedieť presnejšiu hodnotu pH môžeme použiť pH meter).

Na úpravu pH je možné použiť 1M NaOH alebo 1M HCl v závislosti od vyžadovaného pH.

K príprave je možné použiť destilovanú vodu a dokonca i vodovodnú vodu (záleží na zložení – neodporúča sa väčšia koncentrácia železa a chloridov). Jednotlivé zložky živných médií rozpustíme vo vode za neustáleho miešania (pre rýchlejšie rozpustenie môžeme zvýšiť teplotu zahriatím).

Ako stužovadlo sa môže použiť agar, pre mikroorganizmy, ktoré neznášajú prítomnosť organických zlúčenín, sa používa gél kyseliny kremičitej [9].

2.6.2. Sterilizácia

Tento úkon je považovaný za jeden z najdôležitejších v mikrobiológii. V každom mikrobiálnom laboratóriu je sterilizácia laboratórneho skla, médií a pomôcok predpokladom úspešnej práce [16].

Druhy sterilizácie:

- Fyzikálna – využíva sa plameň, žiarenie alebo filtrácia
- Chemická – na chemickú sterilizáciu sa používajú rôzne chemické látky. Najviac sa používajú chlór alebo formaldehyd [16].
- Fyzikálne – chemická – využitie plazmatického výboja.

Bežne používaným prístrojom v laboratóriách je Autokláv. Využíva vlhký teplý vzduch so zvýšením tlakom [12].



Obrázok 4: Autokláv

2.6.3. Očkovanie

Na sledovanie nárast, prípadne úbytku, množstva kvasiniek potrebujeme tieto kvasinky najskôr premiestniť do požadovanej živnej pôdy. Tento prenos sa v mikrobiológii označuje názvom očkovanie. Za očkovanie považujeme prenesenie časti mikrobiálnej populácie z prostredia, v ktorom boli udržiavané, do sterilnej živnej pôdy. Spôsob očkovania sa volí podľa charakteru stanovovaného mikroorganizmu. Základom očkovania je pracovať asepticky – to znamená, že nedochádza ku kontaminácii zo vzduchu alebo pomôcok. Na aseptickú prácu sa používajú očkovačie boxy, ktoré ale nie sú vždy dostupné. Ako vhodná náhrada môže byť práca vykonávaná na čistom stole, ktorý bol vydezinfikovaný čistiacim prostriedkom.

2.6.4. Počítanie kvasiniek

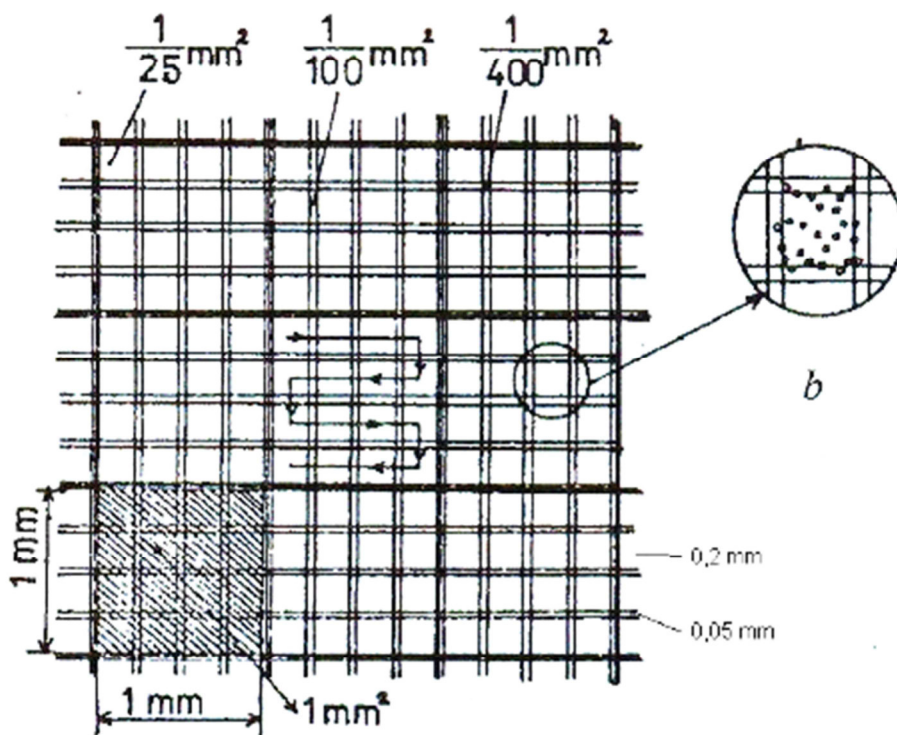
Pred a rovnako po pasterizácii je potreba určiť presné množstvo kvasiniek. Počet kvasiniek sa mení v dôsledku rastu a rozmnožovania. Na výpočet kvasiniek sa používajú dve metódy:

- Priama – mikroskopická metóda
- Nepriama – kultivačná metóda
- Meranie zákalu – nefelometrické a turbidimetrické metódy

Priama metóda spočíva v jednoduchom stanovení počtu buniek v mikroskopickom preparáte. Preparáty sa používajú bez úpravy alebo upravované fixáciou alebo sfarbením. Pri počítaní sa používajú rôzne typy počítacích komôrok (Thomova, Bürkerova ap.). Všetky sa skladajú so silného podložného skla s vyrytou sieťou štvorcov o presne známych objemoch a podložného

sklíčka. Sklíčko sa pokladá na bočné lišty. Tým vzniká medzi sklíčkami priestor o presne definovanej hrúbke.

Bürkerova počítacia komôrka má v strednej časti dve mriežky, skladajúce sa z veľkých a malých štvorčekov a obdĺžnikov o definovaných rozmeroch ako môžeme vidieť na obrázku.



Obrázok 5: Bürkerova komôrka s definovanými rozmermi štvorcov a obdĺžnikov [16]

Následný výpočet počtu buniek v 1 ml kultúry:

$$x = MO \cdot z \cdot X \cdot 1000, \quad (2.3)$$

kde:

x je počet buniek v 1 ml kultúry,

MO je priemerný počet buniek v okienku,

X je prepočet na 1 mm^3 (tvar obdĺžnik má hodnotu 1000)

1000 je prepočet mm^3 na ml [16].

2.6.5. Farbenie kvasiniek

Farbenie kvasiniek je potrebné spraviť, ak chceme zistiť presný podiel živých a mŕtvych kvasiniek vo vzorke. K priamemu farbeniu sa používajú netoxické farbivá, v našom prípade metylénová modrá. Tá sa v živých bunkách mení na nefarebnú formu prostredníctvom redukujúcich enzýmov, mŕtve bunky nemajú reductázovú aktivitu, preto sa farbja namodro [16].

2.7 Charakterizácia, výskyt a použitie plazmatického výboja

2.7.1. Definícia plazmy

V roku 1928 I. Langmuir použil ako prvý človek pojem plazma na označenie vnútornej časti elektrického výboja, na ktorý nemali vplyv steny ani elektródy výbojky [17].

Vzhľadom na to, že každý plyn je v určitej miere ionizovaný sa zaviedla definícia plazmy:

„Plazma je kvázi neutrálny plyn nabitých a neutrálnych častíc, ktorý vykazuje kolektívne správanie.“ [1]

Kvázineutralita plazmy spôsobuje, že plazma je odolná voči menším poruchám. Po každej takejto poruche ma snahu vrátiť sa do pôvodného stavu. Táto stálosť je špecifická pre plazmu a rovnako tak aj pre pevné látky. Pri pevných látkach je stálosť spôsobená veľkými silami pôsobiacimi medzi susednými molekulami na malé vzdialenosti, zatiaľ čo pri plazme je stálosť spôsobená elektrickými silami pôsobiacimi na pomerne veľkú vzdialenosť [18].

V podstate je plazma ionizovaný plyn. Avšak vzhľadom na úplne odlišné správanie plazmy a neutrálneho plynu, zaradíme plazmu do samostatnej skupiny a často býva označovaná ako štvrté skupenstvo vzhľadom na jej odlišnosť od známych skupenstiev ako sú pevné látky, kvapaliny a plyny [19]. Na potvrdenie výskytu plazmatického výboja musíme splniť dve základné podmienky:

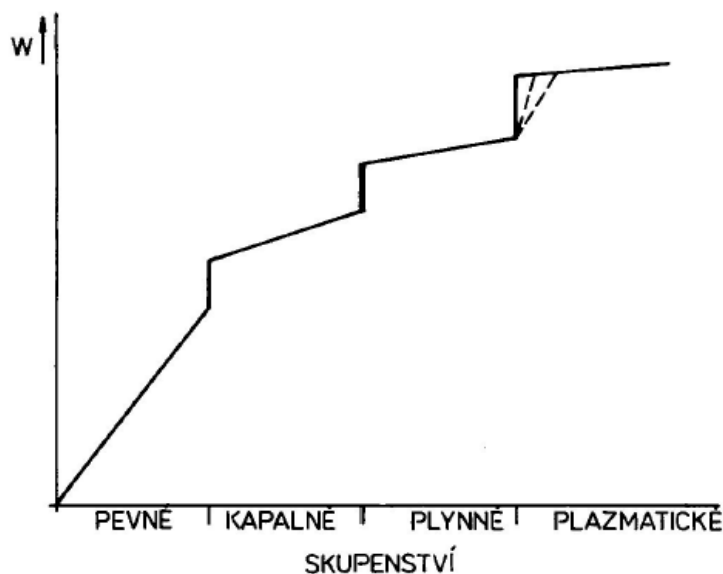
- prítomnosť voľne sa pohybujúcich nabitých častíc,
- veľké množstvo týchto častíc.

Plazma vo všeobecnosti neobsahuje len nabité častice, ale aj určité množstvo neutrálnych častíc [19].

Tabuľka 2: Zmena skupenstva vody s narastajúcou teplotou

Skupenstvo	Teplota (°C)	Forma	Charakteristika
Pevná látka	$T < 0$	Ľad	Molekuly sú limitované v mriežke.
Kvapalina	$0 < T < 100$	Voda	Molekuly sa môžu voľne pohybovať.
Plyn	$T > 100$	Vodná para	Molekuly sa môžu voľne pohybovať na väčšiu vzdialenosť.
Plazma	$T > 10000$	Ionizovaný plyn	Ióny sa elektróny sa môžu nezávisle pohybovať na väčšiu vzdialenosť.

Plazma vzniká vtedy, keď neutrálny plyn (vzniknutý napríklad pri zahriatí vody nad teplotu varu) zahrievame až do momentu dostatočne silných medzimolekulových kolízií a dôjde k odtrhnutiu elektrónov z atómov alebo molekúl podliehajúcich kolízií. Paradoxne ďalšie zahrievanie plazmy nevedie k piatemu skupenstvu hmoty. Plazma vyplývajúca z ionizácie neutrálnych plynov sa skladá z nespočetných množstiev pozitívnych a negatívnych nosičov náboja, ktorých relatívne množstvo je v obrátenom pomere k veľkosti ich jednotlivých nábojov [17].



Obrázok 6: Graf závislosti energie v jednotkovom objemu látky na teplote pre rôzne skupenstvá [18]

Sahova rovnica udáva pomer ionizácie plynu v tepelnej rovnováhe:

$$\frac{n_i}{n_n} \approx 2,4 \cdot 10^{21} \cdot \frac{T^{\frac{3}{2}}}{n_i} \cdot e^{-\frac{U_i}{kT}}, \quad (2.4)$$

kde:

n_i, n_n sú hustoty neutrálnych a ionizovaných atómov – počet častíc v m^3 ,

T je teplota v Kelvinoch,

U_i je ionizačná energia plynu, počet joulov potrebných na odtrhnutie vonkajšieho elektrónu z atómu,

k je Boltzmanova konštanta ($k = (1,380658 \pm 0,000012) \cdot 10^{-23} J \cdot K^{-1}$) [17].

Pri postupnom zvyšovaní teploty zostáva stupeň ionizácie nízky, pokiaľ sa U_i nestane len malým násobkom člena $k \cdot T$. Potom člen $\frac{n_i}{n_n}$ prudko stúpa a plyn je v plazmatickom stave.

Ďalším rastom teploty sa n_n stáva menšie a plazma sa stáva plne ionizovaná – stáva sa silno ionizovanou plazmou.

Kritériom vhodnosti použitia plazmy pre čistiace a aktivačné postupy je nízka teplota iónov a neutrálnych častíc, aby nepoškodili povrch, a vysoká teplota elektrónov, aby bol povrch aktivovaný. Nerovnovážna plazma sa pomerne jednoducho generuje pri nízkych tlakoch. Vákuové komory a čerpacie zariadenia však výrobu predražujú a spomaľujú. Vhodnou alternatívou je použitie dielektrických bariérových výbojov (z angl. Dielectric Barrier Discharge - DBD). Dielektrikum zabráňuje prenosu veľkého náboja a plazma sa neprehrieva. Difúznosť plazmy zabezpečuje prúdiaci režim pracovného plynu alebo prímies vzácnych plynov ako napríklad hélia a argónu [20].

2.7.2. Výskyt plazmy na Zemi

Výskyt plazmy môžeme rozdeliť do 2 kategórii:

- Prirodzený – v ionosfére, v magnetosfére, pri búrkach vo forme bleskov, svit polárnej žiare [20]
- Umelý – vodivý plyn v žiarivkách alebo v neónových reklamách [17].



Obrázok 7: Prirodzený výskyt plazmy na Zemi-blesky

Nerovnovážna plazma ma v porovnaní s vysokoteplotnými a mokkými chemickými postupmi množstvo výhod. Vysoká teplota spôsobuje degradáciu materiálu, množstvo štruktúr je citlivých na vysokú teplotu (nízka teplota topenia použitých materiálov), rôzne koeficienty teplotnej rozťažnosti môžu spôsobiť poškodenie spojenia a ďalšie problémy s tým spojené. V prípade chemických postupov nevyžaduje agresívne chemikálie, či následne sušenie.

2.7.3. Druhy plazmy

- Slabo ionizovaná plazma – je to plazma, v ktorej je koncentrácia nabitých častíc zanedbateľne malá v porovnaní s koncentráciou neutrálnych molekúl. Z tohto tvrdenia jasne vyplýva, že zrážky prevládajú medzi neutrálnymi časticami a nabitými časticami. Vzhľadom na nízku koncentráciu nabitých častíc môžeme považovať ich vzájomné zrážky za výnimočné a môžeme ich zanedbať.
- Silno ionizovaná plazma – tento pojem označuje plazmu, v ktorej prevládajú nabité častice. V tomto prípade predpokladáme, že zrážky prebiehajú len medzi nabitými časticami a vplyv neutrálnych častíc zanedbávame [18].

2.7.4. Difúzny koplanárny povrchový bariérový výboj - DCSBD

Tento výboj generuje tenkú vrstvu makroskopicky difúznej homogénnej nízкотеплотnej plazmy s vysokou objemovou hustotou výkonu pri atmosférickom tlaku v rôznych bežne používaných priemyselných plynov (aj elektronegatívnych) a bol úspešne použitý na aktiváciu povrchu rozličných materiálov ako drevo, netkané textílie, hliník, polyetylénové fólie atď. [17]. V tejto práci bol použitý DBD výboj. Ten je podobný DCSBD výboju, len má menšiu hustotu energie a väčší objem. Následne bol použitý aj na sterilizáciu, spôsobenou

vysokým množstvom nabitých častíc pôsobiacich deštruktívne na bunkovú stenu a tým na celú bunku.

2.8 Sklo

Na opracovanie v plazmatickom výboji sa hodí použiť materiál dostatočne lacný a ľahko dostupný a zároveň inertný. Tomuto popisu najlepšie zodpovedá sklo, ktoré má aj praktickú výhodu – je priehľadné a preto môžeme sledovať niektoré zmeny voľným okom. Zároveň je sklo v súčasnej dobe jedným z najpoužívanějších materiálov na svete. Vďaka svojim jedinečným vlastnostiam (tepelná rozťažnosť, priehľadnosť, odolnosť a minimálna reaktivita) sa stal základným materiálom využívaným nielen na výrobu fliaš, okien či rôznych nádob, ale stal sa i základným materiálom využívaným v každom chemickom laboratóriu.

2.8.1. História

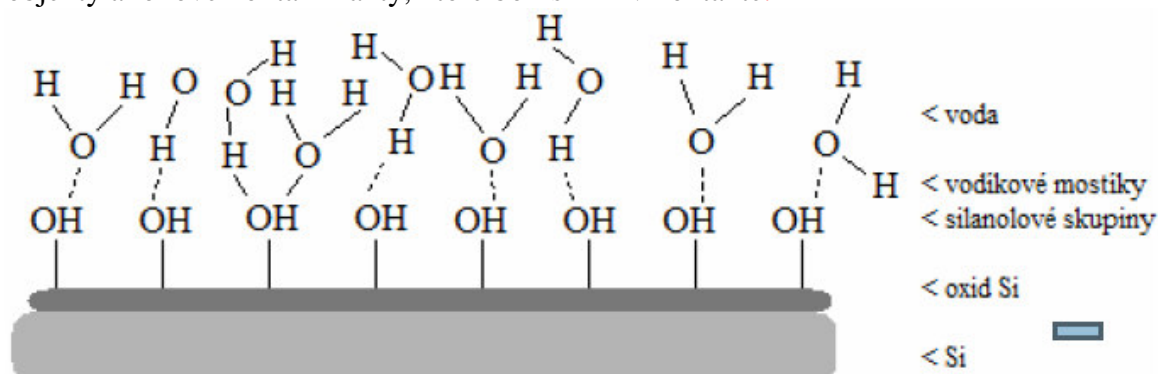
Počiatky výroby skla môžeme nájsť už v starovekom Egypte, kde sa našli rôzne sklenené predmety s odhadovanou dobou vzniku asi pred 3000 rokmi pred naším letopočtom. Poznatky o skle sa prenášali a vylepšovali. Získavali sa dôležité poznatky o fyzikálnych, mechanických a chemických vlastnostiach.

Od minulého storočia si postupne sklo našlo svoje miesto v každom odvetví priemyslu [21].

2.8.2. Štruktúra skla

Hoci vedomosti o fyzikálnych, mechanických a chemických vlastnostiach skla sú známe, o štruktúre skla bolo veľa nejasností. Najprepracovanejšia je štruktúra uhlíku a jeho derivátov a vzhľadom na to, že z chemického hľadiska sú si kremík a uhlík podobné, môžeme niektoré poznatky aplikovať i na kremík. Asi najväčšou zmenou je očakávanie dvojitej a trojitej väzby bežnej pri uhlíku. Pri kremíku dostávame vysokomolekulárne polyméry [21].

Na povrch skla, ktorý je prirodzene hydrofilný, sú za bežných podmienok adsorbované rôzne znečisťujúce látky. Látky ovplyvňujúce adhéziu sú väčšie organické zlúčeniny väčšie častice a objekty a iónové kontaminanty, ktoré boli s ním v kontakte.

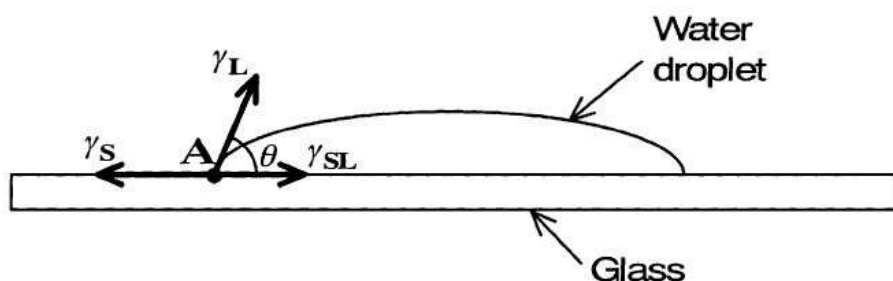


Obrázok 8: Povrch skla po opracovaní v plazme [22]

2.8.3. Meranie kontaktných uhlov

Na potvrdenie účinku pobytu skla v plazmatickom výboji je používaná metóda merania kontaktných uhlov. Táto metóda je lacná a jednoduchá. Využíva len počítač s kamerou

a kvapalinu, ktorá sa jemne položí na povrch. Tento povrch práve mení svoje vlastnosti po pobyte v plazmatickom výboji. Zároveň zmena povrchovej energie skla koreluje s hodnotou povrchovej energie. Ako testovacia kvapalina sa volí destilovaná voda. Keďže toto opracovanie nemá trvalý charakter, sledovali sme i starnutie skla („ageing“ effect) a zmenu kontaktného uhla s tým spojenú.



Obrázok 9: Stanovenie kontaktného uhla [23]

Vzťah medzi uhlom zmáčania θ a jednotlivými medzifázovými energiami je daný Youngovou rovnicou:

$$\gamma_L \cdot \cos \theta = \gamma_S - \gamma_{SL} \quad (2.5)$$

kde:

θ je uhol zmáčania,

γ_L je povrchová energia kvapaliny,

γ_S je povrchová energia tuhej látky,

γ_{SL} je medzifázová energia tuhá látka – kvapalina [23].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Príprava kultivačného média

Do Erlenmeyerovej banky sme pripravili kultivačné médium vhodné pre kultiváciu kvasiniek druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Na obe experimentálne časti sme potrebovali približne 50 ml kultivačné média. Do Erlenmeyerovej banky sme odvážili 2 g glukózy, 0,25 g peptonu, 0,25 g kvasničného extraktu a nakoniec sme pridali 50 ml destilovanej vody. Kvasničný extrakt sme pridali do zmesi ako zdroj vitamínov a iných rastových faktorov. Pepton slúži ako zdroj aminokyselín, peptidov a ďalších rozpustných komponentov. Následne sme zmes dôkladne premiešali a ako uzáver sme použili predpripravenú vatovú zátku. Nakoniec sme vatovú zátku zakryli alobalom a nechali sterilizovať v autokláve po dobu 20-30 minút pri pretlaku 0,1 MPa. Po sterilizácii sme takto sterilizované kultivačné médium zakryté zátkou s alobalom umiestnili do chladničky.

3.2 1. časť – plazma ako pasterizačný krok

3.2.1. Očkovanie kvasiniek do kultivačného média

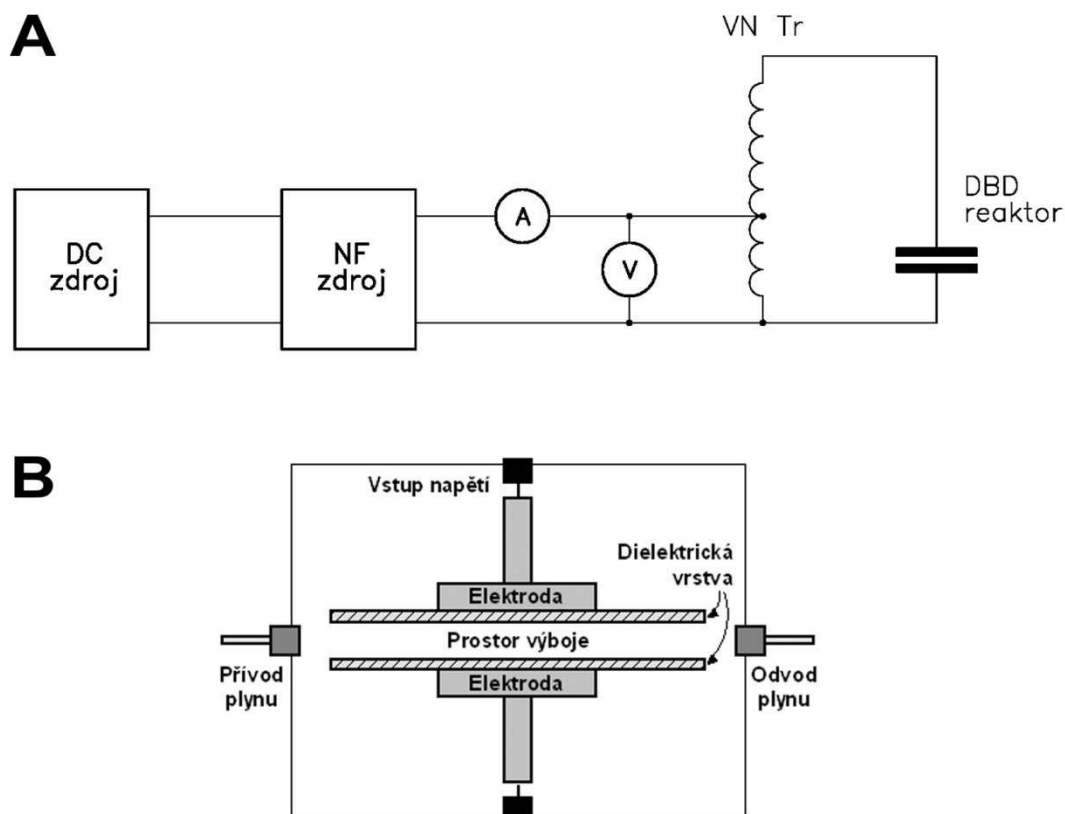
Najskôr bolo očkované médium vytiahnuté z chladničky a ponechané stáť, dokým nemalo približne laboratórnu teplotu. Očkovanie prebiehalo na pracovnom stole očistenom dezinfekčnými prostriedkami na zabezpečenie maximálnej možnej aseptickkej práce. Očkovali sme so šikmého agaru, na ktorom bola kultúra umiestnená. Na očkovanie sme použili očkovaciu kličku, ktorú sme po každom nabrátí mikroorganizmov vyžíhali v kahane. Do kultivačného média sme naočkovali celkom 3-krát maximálne možné množstvo mikroorganizmov nabrátých pomocou očkovacej kličky. Po očkovaní sme vyžíhali okraj Erlenmeyerovej banky a vatovú zátku pre prípadné vzdušné znečistenie inými mikroorganizmami. Následne sme banku uzavreli a umiestnili do prostredia s vhodnou teplotou – približne 27 °C. Po 4 dňoch sme skontrolovali uchytenie kultúry kvasiniek v kultivačnom médiu.

3.2.2. Aplikácia kvasiniek na Bürkerovu komôrku

Aplikácia kvasiniek prebiehala v priestore kahana pre zabezpečenie aseptickkej práce. Extrakt s kvasinkami sa najskôr dôkladne premiešal, aby sa zhomogenizoval, a vo všetkých miestach bola rovnaká koncentrácia kvasiniek. Následne bola nanosená sklenenou tyčinkou, ktorá bola jemne vyžíhaná v kahane, malá kvapka extraktu. Po nanesení sme sklenú tyčinku aj okraj banky a vatovú tyčinku umiestnili do plameňa kahana, aby sa zamedzilo kontaminácii.

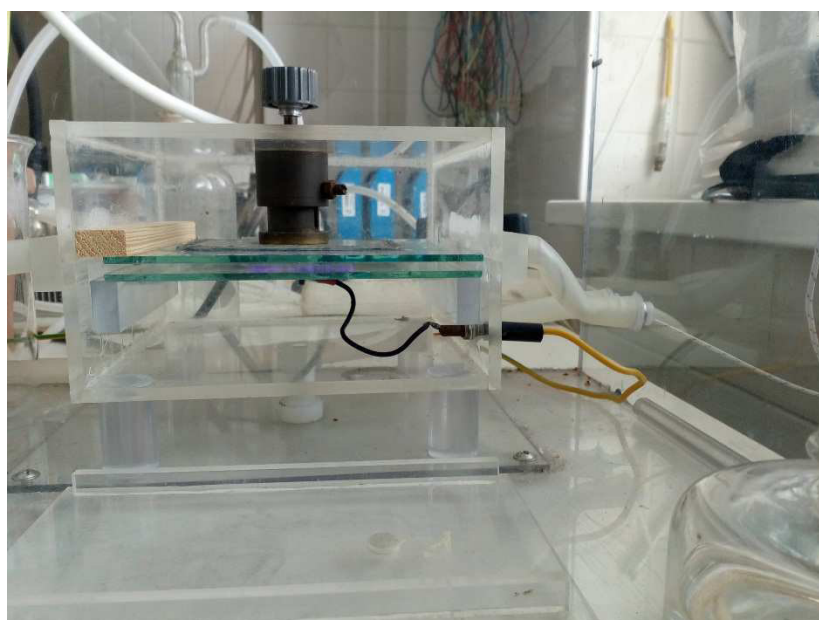
3.2.3. Plazmatický výboj

Aparatúra bola založená na princípu objemového dielektrického baruérového výboja. Plazmové zariadenie sa skladá z regulovateľného zdroja jednosmerného (DC) napätia, vysokofrekvenčného zdroju, vysokonapäťového (HF) transformátoru a DBD reaktoru [24]. Výboj bol generovaný medzi dvoma elektródami, pričom objem výboja sa dal regulovať jednoducho pomocou šróbu napojenom na hornej elektróde. Vzdialenosť sme použili asi 1 cm, aby sa vzorka jednoducho vyberala a nekontaminovala sa o okraje elektród. Ďalšej kontaminácii bolo zamedzené umiestnením aparatúry do boxu a umiestnením zapáleného kahanu do vnútra boxu.



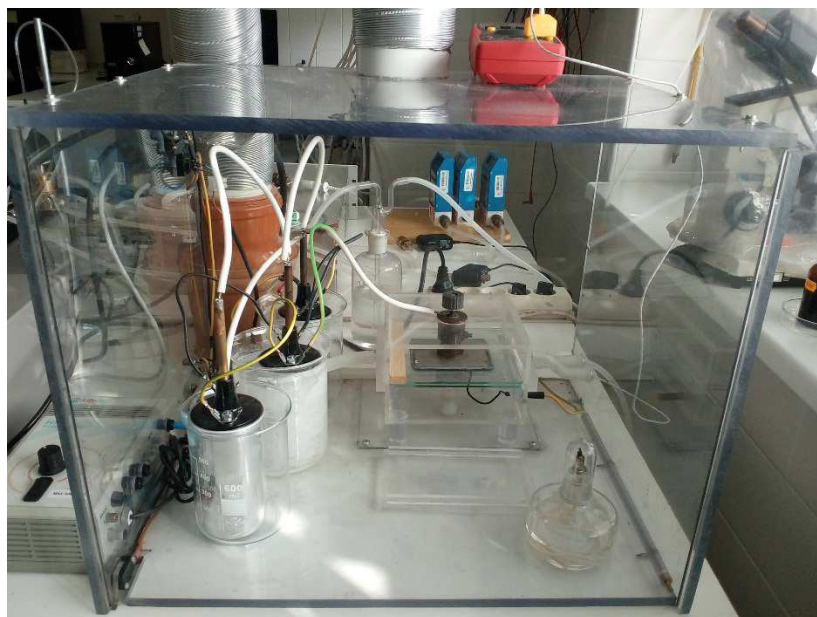
Obrázok 10: Schéma aparatury [24]

Napätie medzi elektródami je nastaviteľné v rozmedzí 3-10 kV, frekvenciou 10kHz. Objem bol daný elektródami o rozmeroch 90×70 mm [24].



Obrázok 11: Plazmatický výboj tvoriaci sa medzi elektródami

Teplota bola sledovaná pridaným teplotným čidlom umiestneným na spodnej elektróde. To nám umožňovalo merať teplotu i za chodu prístroja, pri generácii plazmy.



Obrázok 12: Meriaca aparatúra spolu s kahanom na udržanie sterilnej práce

Ako pracovný plyn bola použitá zmes dusíka s kyslíkom v pomere 1,8:0,2. Prietok plynov bol meraný a regulovaný prietokomerami (uvedené na obrázku 16). Tieto plyny boli zmiešané a privádzané do DBD reaktoru.



Obrázok 13: Plynové bomby s dusíkom a kyslíkom

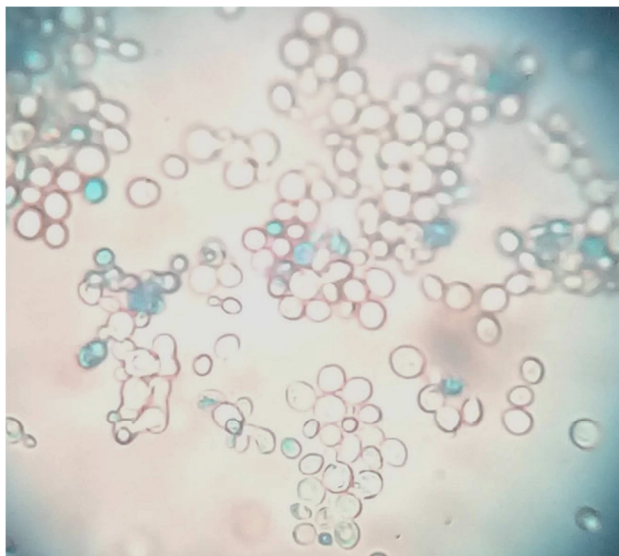
3.2.4. Úprava vzorku v plazmatickom výboji

Vzorka nanosená na Bürkerovej komôrke bola umiestnená do priestoru medzi elektródami, kde sa generoval plazmatický výboj. Následne sme po určitej dobe 0-100 sekúnd po stanovenom kroku 10 sekúnd nechali vzorku v tomto výboji. Po skončení procesu sme Bürkerovu komôrkou vytiahli z priestoru elektród pomocou pinzety. Počas úpravy v plazme sme sledovali zmenu teploty pomocou teplotného čidla umiestneného na spodnej elektróde.

3.2.5. Farbenie vzorky

Po vybratí Bürkerovej komôrky sme na vzorku opatrne kvapli malé množstvo farbiva – metylénovej modrej. Tá sa premiešala s pôvodnou vzorkou kvasiniek a zafarbila mŕtve

kvasinky, pričom kvasinky živé, schopné rozmnožovania a metabolizmu, ponechala nezafarbené.



Obrázok 14: Farbenie kvasiniek

3.2.6. Počítanie kvasiniek

Kvasinky boli počítané v jednotlivých okienkach Bürkerovej komôrky. Na každý časový interval, každých 10 sekúnd, sme odčítali počet živých a mŕtvych kvasiniek v 10 okienkach. Paralelne sme robili dva pokusy.

3.3 2. časť – úprava povrchu skla

3.3.1. Príprava skla

Na experiment sme použili sklíčka o rozmeroch $4,9 \times 4,9 \times 0,1$ cm. Tieto sklíčka sme najskôr umyli vo vode s použitím bežne dostupného saponátu. Týmto krokom sme odstránili hrubé nečistoty vzniknuté rezaním skla a balením, ktorými bol povrch skla zanesený. Na menšie nečistoty sme použili následne čistenie ultrazvukom ultrazvukovou čističkou uvedená na obrázku 15. Sklo sme opatrne vložili sieťku, tú ponorili do nádoby na generáciu ultrazvuku, ktorá bola naplnená destilovanou vodou. Všetky sklíčka boli čistené ultrazvukom 20 minút pri teplote $33\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po skončení čistenia sme sklíčka vytiahli s nádoby, osušili a použili hneď na ďalší krok, aby sa zabránilo opätovnej kontaminácii zo vzduchu.



Obrázok 15: Ultrazvuková čistička

3.3.2. Úprava povrchu skla v plazme

Osušené sklíčka boli následne dané medzi 2 elektródami, medzi ktorými sa generoval plazmatický výboj. Ako plyn sme použili zmes dusíka a kyslíka v pomere 1,8:0,2. Túto variantu sme zvolili vďaka jej jednoduchosti a finančnej nenáročnosti. Na reguláciu prietoku sme použili prietokomery. Tie zaručovali stabilný prísun zmesi o určenom pomere.



Obrázok 16: Použité prietokomery pre dusík a kyslík

Na pridanom teplomere sme sledovali teplotu medzi elektródami. Sklíčko sme umiestnili do výboja po stanovenú dobu – 1, 2 a 3 minúty. Pre každú časovú hodnotu sme použili 5 sklíčok. Po vybraní sklíčok s prístroja sme ich okamžite umiestnili do sterilných Petriho misiek. Na

prenos s prístroja do Petriho misiek sme použili pinzetu, ktorú sme pred každým použitím vyžíhali v plameni kahana. Kahan bol umiestnený pri elektródach, aby sa zamedzilo kontaminácii, zrýchlil prenos a zaručila maximálna možná aseptická práca.

3.3.3. Prenos kultivačného média na povrch skla

Na každé sklíčko bolo následne umiestnené malé množstvo pripraveného kultivačného média. Množstvo kultivačného média približne zodpovedalo veľkosti povrchu sklíčka, kedy základný predpoklad bolo zalatie jeho celého povrchu malou vrstvou. Práca prebiehala v blízkosti kahana a po každom odliatí kultivačného média sa okraj banky umiestnil do plameňa. Po dokončení všetkých 15 vzoriek sa Petriho misky zabalili do potravinárskej fólie, ktorá zamedzovala okolitému znečisteniu a rovnako zamedzila odpareniu vody z Petriho misiek. Následne boli Petriho misky vložené do chladničky po dobu 5 dní.

3.3.4. Riedenie kvasiniek

Kvasinky v kultivačnom médiu pripravené v 1. časti sme nariesili použitím 5 ml tohto extraktu do 50 ml destilovanej vody. Následne sme takto pripravenú destilovanú vodu z malým množstvom kvasiniek premiešali, aby sme rozmiestnili kvasinky po celom objeme.

3.3.5. Príprava sklíčiek na aplikáciu kvasiniek

Sklíčka umiestnené v Petriho miskách sme vybrali s chladničky a odbalili z fólie. Zbytky kultivačného média sme z Petriho misiek odliali do umývadla.

3.3.6. Aplikácia kvasiniek na povrch skla

Na aplikáciu kvasiniek sme použili pipetu, ktorú sme jemne vyžíhali v plameni kahana. Potom sme nabrali 0,5 ml narieseného roztoku kvasiniek v destilovanej vode. Tento objem sme rovnomerne naniesli na celý povrch sklíčka. Po nanesení sme pipetu opäť jemne vyžíhali a pokračovali s ďalšou vzorkou. Po aplikácii kvasiniek na všetky vzorky sme tieto vzorky opäť zabalili do potravinárskej fólie a ponechali kultivovať pri laboratórnej teplote.

3.3.7. Počítanie kvasiniek

Sklenenou tyčinkou sme odobrali malú kvapku vody umiestnenej na sklíčku, kvapli na Bürkerovu komôrku a prikryli krycím sklíčkom. Následne sme sledovali množstvo kvasiniek v 10 okienkach Bürkerovej komôrky. Tieto získané hodnoty sme porovnali s počtom kvasiniek odmeraných po nariesení kvasiniek.

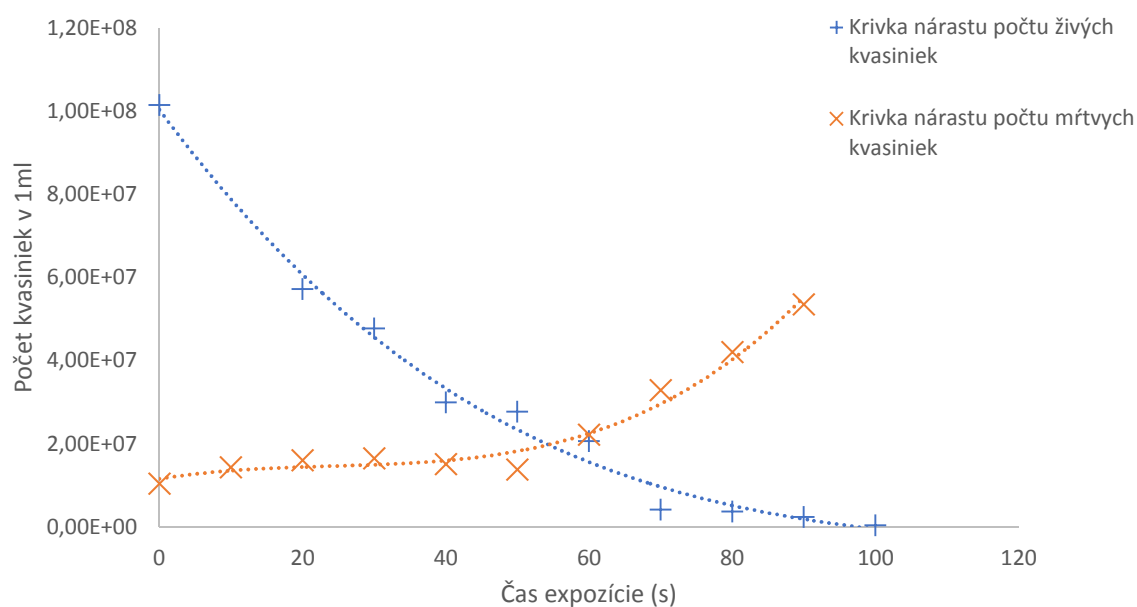
3.3.8. Meranie kontaktných uhlov ako dôkazu vplyvu plazmatického výboja na sklo

Na potvrdenie účinnosti plazmatického výboja na povrch skla sme použili metódu kontaktných uhlov. Túto metódu sme spravili na 40 vzorkách. Tieto vzorky boli umiestnené do plazmatického výboja po dobu 60-240 sekúnd po kroku 60 sekúnd. Pri opracovaní 60 s bolo najskôr vložené do výboja 5 vzoriek, ktoré sme po 60 sekundách vytiahli. Následne sme na ne kvapli opatrne malú kvapku vody a zmerali kontaktný uhol. Vzhľadom na dĺžku kvapkania destilovanej vody a dĺžku merania sme určili ako časový interval od vybratia po odmeranie na 5 minút. Obdobne boli spravené pokusy s 1 hodinovým intervalom, kde bola vzorka ponechaná po vybratí z plazmatického výboja 1 hodinu odležať.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 1.časť experimentálnej práce - pasterizácia

Jednotlivé množstvá kvasiniek, živých aj mŕtvych, boli spracované do tabuľky, kde sme spočítali celkové množstvo kvasiniek v danom intervale v 10 okienkach, vždy v dvoch paralelných pokusoch. Toto celkové množstvo sme vydělili počtom okienok, v našom prípade 20. Z tohto nám vyšlo priemerné množstvo kvasiniek v okne. Následne sme pomocou rovnice (2.3) vypočítali množstvo kvasiniek v jednom mililitri. Tieto hodnoty sme následne vložili do grafu. Vytvorili sme graf závislosti nárastu živých a mŕtvych kvasiniek na čase a potom sme vytvorili letaltnú krivku závislosti zlogaritmovaného počtu mikroorganizmov na čase pobytu v plazmatickom výboji. Letaltná krivka nám zobrazuje reálnu účinnosť plazmatického výboja na tieto kvasinky. Zároveň sme sledovali teplotu teplotným čidlom umiestneným na spodnej elektróde. Teplota sa pohybovala v rozmedzí 25,3 až 27,3 °C.



Obrázok 17: Graf závislosti počtu kvasiniek v 1 ml na dobu expozície vzorky v plazmatickom výboji

Tabuľka 3: Počet kvasiniek v jednotlivých okienkach pre vzorku a i paralelnú vzorku b, a celkový počet kvasiniek v 1 ml

Doba expozície (s)	0		10		20		30		40	
Číslo okienka	ŽK	MK	ŽK	MK	ŽK	MK	ŽK	MK	ŽK	MK
1.a	90	3	60	14	66	12	57	18	35	26
2.a	85	6	70	15	58	22	54	25	40	11
3.a	80	10	64	10	34	18	46	17	46	30
4.a	76	4	54	14	44	10	48	15	52	22
5.a	76	7	48	16	47	10	50	13	38	18
6.a	72	6	51	20	35	14	44	10	30	20
7.a	79	8	40	14	38	10	48	22	24	14
8.a	78	9	38	16	50	10	30	17	49	14
9.a	76	6	42	19	48	18	44	14	24	10
10.a	96	10	41	16	53	16	41	15	30	11
1.b	120	14	24	9	55	10	44	17	10	9
2.b	104	17	50	10	46	9	51	18	30	13
3.b	106	20	55	15	62	14	58	12	35	17
4.b	128	10	48	14	84	21	64	28	34	18
5.b	138	11	85	13	96	24	53	17	17	9
6.b	136	18	55	14	72	26	54	21	30	13
7.b	122	14	53	11	76	27	54	18	18	10
8.b	142	9	47	16	66	19	31	7	25	16
9.b	108	13	54	18	48	17	39	10	17	8
10.b	119	13	58	13	66	13	45	15	15	13
Celkový počet kvasiniek v okienkach	2031	208	1037	287	1144	320	955	329	599	302
Priemerný počet kvasiniek	101,55	10,40	51,85	14,35	57,20	16,00	47,75	16,45	29,95	15,10
Smerodajná odchýlka	23,22	4,52	12,43	2,83	15,97	5,59	8,32	4,91	11,26	5,74
Počet kvasiniek v 1 ml	101550000	10400000	51850000	14350000	57200000	16000000	47750000	16450000	29950000	15100000

Tabuľka 4: Počet kvasiniek v jednotlivých okienkach pre vzorku a i paralelnú vzorku b, a celkový počet kvasiniek v 1 ml

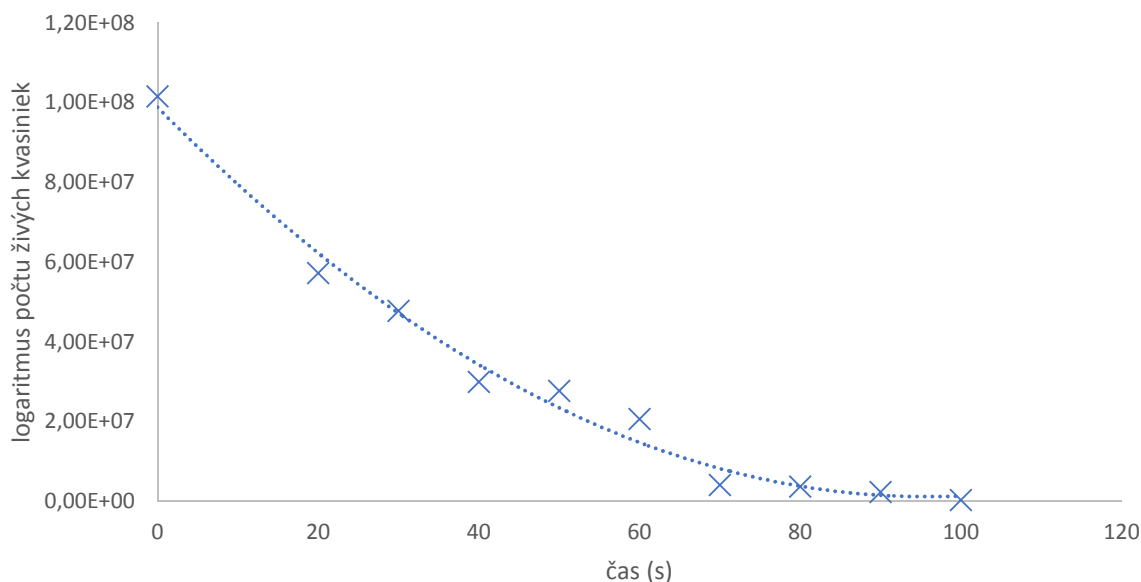
Doba expozície (s)	50		60		70		80	
Číslo okienka	ŽK	MK	ŽK	MK	ŽK	MK	ŽK	MK
1.a	29	9	50	21	7	44	0	22
2.a	33	11	46	19	7	51	1	24
3.a	41	18	24	26	9	46	2	70
4.a	50	13	10	18	8	40	1	43
5.a	24	8	22	8	5	38	0	54
6.a	21	10	14	11	7	36	2	36
7.a	24	17	15	5	8	39	1	40
8.a	30	12	27	8	4	52	3	26
9.a	31	15	28	12	5	41	4	48
10.a	20	6	40	17	2	45	2	38
1.b	18	15	8	40	1	13	10	56
2.b	31	18	12	38	1	12	5	24
3.b	30	19	22	20	3	28	0	16
4.b	22	11	18	38	2	21	2	20
5.b	18	8	7	5	4	15	8	56
6.b	19	11	8	8	2	18	4	40
7.b	17	7	26	32	1	36	12	54
8.b	28	19	11	48	1	12	5	56
9.b	34	20	20	40	5	24	7	58
10.b	35	28	5	30	1	46	5	60
Celkový počet kvasiniek v okienkach	555	275	413	444	83	657	74	841
Priemerný počet kvasiniek	27,75	13,75	20,65	22,20	4,15	32,85	3,70	42,05
Smerodajná odchýlka	8,28	5,39	12,52	13,15	2,69	13,34	3,30	15,49
Počet kvasiniek v 1 ml	27750000	13750000	20650000	22200000	4150000	32850000	3700000	42050000

Tabuľka 5: Počet kvasiniek v jednotlivých okienkach pre vzorku a i paralelnú vzorku b, a celkový počet kvasiniek v 1 ml

Doba expozície (s)	90		100	
Číslo okienka	ŽK	MK	ŽK	MK
1.a	1	30	1	35
2.a	1	51	0	42
3.a	4	47	0	51
4.a	2	48	0	30
5.a	1	48	1	28
6.a	2	32	2	40
7.a	0	40	0	22
8.a	0	56	0	18
9.a	3	44	0	36
10.a	6	51	2	41
1.b	4	10	0	72
2.b	2	71	0	44
3.b	0	40	0	51
4.b	6	46	0	44
5.b	4	56	0	33
6.b	3	72	0	16
7.b	2	80	1	44
8.b	4	56	0	35
9.b	2	76	0	48
10.b	0	66	0	51
Celkový počet kvasiniek v okienkach	47	1070	7	781
Priemerný počet kvasiniek	2,35	53,50	0,35	39,05
Smerodajná odchýlka	1,82	13,63	0,65	12,71
Počet kvasiniek v 1 ml	2350000	53500000	350000	39050000

Z grafu uvedenom na obrázku 13 jasne vidíme pokles počtu kvasiniek v závislosti na dĺžke pobytu v plazmatickom výboji. Zároveň s poklesom počtu živých sledujeme i nárast počtu mŕtvych organizmov neschopných ďalšieho rast a množenia. Táto krivka má klesajúci charakter a z tohto grafu vidíme, že pri hodnote 100 sekúnd, čo zodpovedá pobytu vzorky v plazmovom výboji, je koncentrácia kvasiniek na minime. Z toho môžeme usudzovať, že táto metóda je účinná pri použití intervale. Na jej overenie sme spočítali i množstvá mŕtvych kvasiniek a rovnako ich vložili do grafu a porovnali. Krivka počtu mŕtvych kvasiniek v závislosti na čase má exponenciálny tvar, čo potvrdzuje náš experiment a sterilizačný účinok plazmatického výboja. Po zlogaritmovaní počtu kvasiniek sme dostalo krivku označovanú ako letalitná krivka. Vo všeobecnosti sa očakáva letalitná krivka ako funkcia lineárne klesajúca s časom. V tomto prípade sa ale rozhodne nejdená o funkciu lineárnu. S najväčšou pravdepodobnosťou je to dané malým množstvom výsledkov, nepresnosťou pri počítaní kvasiniek a tým spôsobenou odchýlkou alebo nejednoznačným vplyvom plazmy na tieto kvasinky. Z tohto môžeme usudzovať, že pri ďalších pokusoch by mala krivka nadobudnúť lineárny alebo neúplný lineárny charakter. Pri oboch krivkách boli vynechané dve hodnoty: Letalitná krivka – vynechaná hodnota pre 10 sekúnd a pri krivke úmrtia kvasiniek vynechaná hodnota 100 sekúnd, ktoré neodpovedali celkovému charakteru funkcie a pre optimálnejší výsledok boli preto vynechané. Počet mŕtvych kvasiniek nezodpovedá celkovému počtu mŕtvych kvasiniek ako to vidíme v grafe na obrázku 17, pretože veľké množstvo kvasiniek boli v plazmatickom výboji poškodené a jednotlivé nemerateľné orgány boli roztrúsené po celom objeme roztoku.

Letalitná krivka



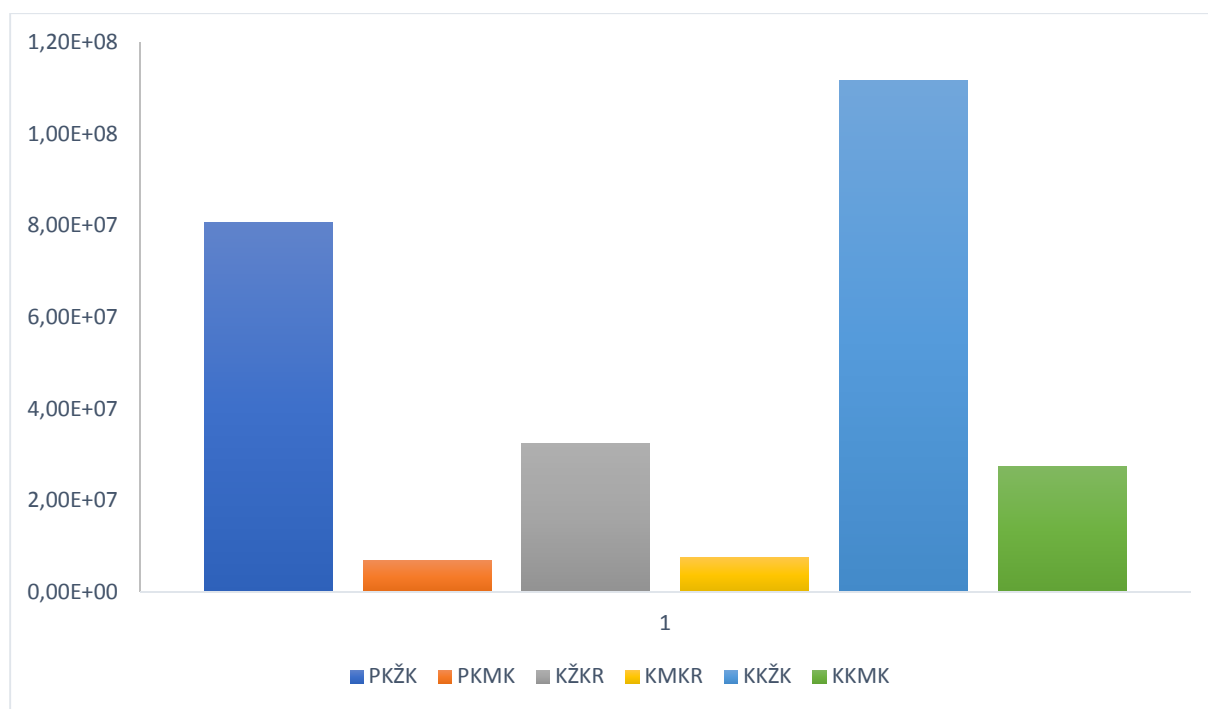
Obrázok 18: Letalitná krivka

4.2 2.časť experimentálnej práce – aktivácia povrchu skla, vytvorenie filmu a meranie kontaktných uhlov

Boli odčítané jednotlivé množstvá kvasiniek pred riedením (ako počiatočné hodnoty boli použité hodnoty z tabuľky 3 pre dobu spracovania 0 sekúnd), po riedení a následne po 24 hodinách. Tieto množstvá boli spracované do obdobne ako prvej časti experimentálnej práce. Následne boli hodnoty spracované grafu na obrázku 19, kde môžeme vidieť jednotlivé koncentrácie kvasiniek v 1 ml.

Tabuľka 6: Jednotlivé koncentrácie živých a mŕtvych kvasiniek

Číslo okienka	Počiatočná koncentrácia		Koncentrácia po riedení		Koncentrácia po 24 hodinách	
	ŽK	MK	ŽK	MK	ŽK	MK
1.	90	3	34	5	96	16
2.	85	6	25	4	91	24
3.	80	10	12	0	101	29
4.	76	4	22	3	131	36
5.	76	7	54	12	106	24
6.	72	6	60	16	118	31
7.	79	8	21	5	132	18
8.	78	9	31	11	105	30
9.	76	6	29	6	117	29
10.	96	10	38	14	120	38
Celkový počet kvasiniek v okienkach	808	69	326	76	1117	275
Priemerný počet kvasiniek	80,8	6,9	32,6	7,6	111,7	27,5
Smerodajná odchýlka	7,0	2,3	14,1	5,0	13,4	6,7
Počet kvasiniek v 1 ml	80800000	6900000	32600000	7600000	111700000	27500000
Skratka	PKŽK	PKMK	KŽKR	KMKR	KKŽK	KKMK



Obrázok 19: Graf koncentrácie kvasiniek v počiatkovej fáze, po nariedení a po skončení experimentu podľa tabuľky 6.

Z grafu na obrázku 19 môžeme vidieť úbytok počtu kvasiniek pri nariedení vzorky a následné zvýšenie počtu kvasiniek po 24 hodinách kultivácie na sklíčku opracovanom v plazmatickom výboji a vytvorení tenkého filmu živného média. Z toho môžeme jednoznačne usúdiť, že sa podarilo vyrobiť na povrchu skla film s dostatočným obsahom látok na prežitie a rozmnožovanie kvasiniek druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Po 24 hodinách sa zvýšilo množstvo kvasiniek na hodnotu vyššiu než bola pôvodná koncentrácia. Na druhej strane sa zvýšilo i množstvo mŕtvych kvasiniek. Tento vedľajší efekt pre je pre výsledok zanedbateľný, ale ukazuje určité obmedzenie vrstvy na povrchu sklíčka. Tá pravdepodobne dosiahla maximálneho množstva kvasiniek a množstvo živného média v tejto vrstve pokleslo pod prijateľnú mez. V najbližšom čase by sa očakával pokles počtu kvasiniek a nárast počtu mŕtvych kvasiniek. Z 15 vzoriek vložených do plazmatického výboja na obdobie 1-3 minúty, po kroku 1 minúta, sa nepreukázali žiadne odchýlky. Vo všetkých vzorkách bol počet kvasiniek skoro identický. Do tabuľky sme uviedli jednu vzorku opracovanú v plazmatickom výboji 2 minúty s priemerným množstvom kvasiniek.

Meranie kontaktných uhlov

Ako vidíme v tabuľke 7, priemerné hodnoty uhlu zmáčania sa z časom postupne zväčšujú. Je to spôsobené starnutím skla, ktoré s postupom čase opätovne stráca svoje hydrofilné vlastnosti nadobudnuté po opracovaní v plazmatickom výboji. Tento efekt, ako si môžeme všimnúť v tabuľke 7, sa prejavuje rôzne pri odlišných dobách opracovania. Pri dobe opracovania 180 sekúnd je rozdiel v priemernej hodnote uhlu zmáčania meranej po 5 minútach a po 1 hodine najväčší, pri dobe opracovania 60 sekúnd najmenší. Tieto rozdiely budú pravdepodobne spôsobené aj povrchom sklíčka, na ktorý sme kvapkali destilovanú vodu, jeho nehomogenitou a určitou chybou pri kvapkaní, kde treba kvapku len jemne položiť na povrch skla.

Tabuľka 7: Meranie kontaktných uhlov

	Uhol zmáčania θ							
Doba opracovania vo výboji (s)	60		120		180		240	
Čas pozorovania po opracovaní	5 minút	1 hodina	5 minút	1 hodina	5 minút	1 hodina	5 minút	1 hodina
1.	41,3	31,2	36,5	46	30,3	42,6	28,2	28,4
2.	36,4	44,1	38,5	42	23,9	38,6	38,1	28,6
3.	45,4	45,5	33,4	43,8	21,7	35,6	33,1	41,5
4.	44,8	45,2	46,6	41,4	32,8	40,6	37,4	41,3
5.	39,4	45	38,2	42,8	23,7	38,8	30,9	40,6
6.	37,6	36,5	36,2	43,2	24,9	37	36,9	38,4
7.	42,2	32,9	27,3	31,4	36,3	42,9	41,5	38,9
8.	38,4	41,1	25,2	32,5	23,5	39,4	40,9	33,9
9.	38,6	40,8	36,1	39,4	31,6	40,8	27	28
10.	37,4	46,5	48,1	39,6	34,3	41	26,1	39,7
Priemerná hodnota uhlu zmáčania	40,15	40,88	36,61	40,21	28,3	39,73	34,01	35,93
Smer. odchýľka	2,98	5,25	6,82	4,53	5,04	2,20	5,44	5,37

5 ZÁVER

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo preštudovať vplyv plazmatického výboja na cieľovú skupinu mikroorganizmov. Za skúmané mikroorganizmy sme použili kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae*, ktoré sú nielen ľahko a finančne dostupné, ale sú aj bohato technologicky využívané v pivovarníctve, pekárске a liehovarníctve. Tieto kvasinky sa pri výrobe piva filtrujú alebo pasterizujú, pričom v oboch prípadoch sa jedná o silne rušivý zásah do senzorických a chuťových vlastností piva. Dosiahnuté experimentálne výsledky potvrdili, že plazmatický výboj môže byť použitý ako pasterizačný krok pri tejto výrobe piva pri zotrvaní vzorky vo výboji po dobu minimálne 100 sekúnd. Výhodou plazmatického výboja je jeho teplota, ktorá v priebehu experimentu nestúpila nad 27,4 °C, čo zamedzuje akémukoľvek tepelnému poškodeniu vzorky piva. Z týchto údajov môžeme potvrdiť, že táto metóda je aplikovateľná a pravdepodobne pritom zachováva všetky nutričné zloženie i senzorické a chuťové vlastnosti piva.

V druhej časti práce sme sa zaoberali možnosťou vytvorenia tenkého filmu na povrchu skla upraveného v plazmatickom výboji. Ako látku na vytvorenie filmu sme použili živné médium vhodné pre kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae*, pripravené v časti 2.1. Následne sme na tento film naniesli malé množstvo kvasiniek a sledovali nárast, čo by potvrdilo vytvorenie vrstvy vhodnej k rozmnožovaniu týchto kvasiniek. Výsledky tohto experimentu sú uvedené v obrázku 19, kde jasne môžeme vidieť nárast počtu kvasiniek druhu *Saccharomyces cerevisiae* na počet väčší než počet pred nariadením do destilovanej vody. Z tohto môžeme usudzovať, že sa nám podarilo vytvoriť tenký film živného média na povrchu skla, ktorý poskytoval živiny na rozmnožovanie kvasiniek. Týmto spôsobom sme schopný jednoducho a rýchlo schopný namnožiť kvasinky, pričom by nám stačilo takéto sklíčko a malé množstvo kvasiniek. Hoci by sa malo pracovať sterilne, je táto metóda jednoduchá a v praxi použiteľná.

Na potvrdenie pôsobenia plazmatického výboja na povrch skla sme použili metódu kontaktných uhlov. Výsledky v tabuľke 7 ukazujú, že pôsobením plazmatického výboja na povrch skla sa tento povrch mení, stáva sa hydrofilnejším k použitej tekutine. Vzhľadom na efekt opracovania, starnutie opracovania, sme pri vytváraní filmu na povrchu skla, vkladali toto sklo do kultivačného okamžite vo vybratí s plazmatického výboja, aby sa na povrch naviazalo maximálne množstvo živného média.

Pri použití metódy pasterizácie treba ešte preskúmať vplyv plazmatického výboja na celkové zloženie pívneho vzorku a rovnako pri vytváraní vrstvy na povrchu skla treba podrobnejšie preskúmať zmeny a naviazanie média na povrch skla. Vzhľadom na bezpečnosť a použitie týchto krokov v praxi sa nimi budeme zaoberať v ďalšej časti štúdia.

6 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ŽK – počet živých kvasiniek

MK – počet mŕtvych kvasiniek

PKŽK – počiatočná koncentrácia živých kvasiniek

PKMK – počiatočná koncentrácia mŕtvych kvasiniek

KŽKR – koncentrácia živých kvasiniek po riedení

KMKR – koncentrácia živých kvasiniek po riedení

KMKR – koncentrácia mŕtvych kvasiniek po riedení

KKŽK – konečná koncentrácia živých kvasiniek

KKMK – konečná koncentrácia živých kvasiniek

DCSBD – difúzny koplanárny povrchový bariérový výboj

DBC – dielektrický bariérový výboj

7. ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Mapa spotreby piva [6].....	10
Obrázok 2:Tvar a zloženie kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
Obrázok 3: Univerzálne živné médium-agar	13
Obrázok 4: Autokláv	15
Obrázok 5: Burkerova komôrka s definovanými rozmermi štvorcov a obdĺžnikov	16
Obrázok 6: Graf závislosti energie v jednotkovom objemu látky na teplote pre rôzne skupenstvá	18
Obrázok 7: Prirodzený výskyt plazmy na Zemi-blesky	19
Obrázok 8: Povrch skla po opracovaní v plazme	20
Obrázok 9: Stanovenie kontaktného uhla.....	21
Obrázok 10: Schéma aparatury	23
Obrázok 11: Plazmatický výboj tvoriaci sa medzi elektródami.....	23
Obrázok 12:Meriaca aparatura spolu s kahanom na udržanie sterilnej práce	24
Obrázok 13: Plynové bomby s dusíkom a kyslíkom.....	24
Obrázok 14: Farbenie kvasiniek.....	25
Obrázok 15: Ultrazvuková čistička	26
Obrázok 16: Použité prietokomery pre dusík a kyslík	26
Obrázok 17: Graf závislosti počtu kvasiniek v 1 ml na dobe expozície vzorky v plazmatickom výboji.....	28
Obrázok 18: Letalitná krivka.....	32
Obrázok 19: Graf koncentrácie kvasiniek v počiatočnej fáze, po nariedení a po skončení experimentu podľa tabuľky 6.	34

8. ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Delenie mikroorganizmov na základe teploty prežitia [10]	13
Tabuľka 2: Zmena skupenstva vody s narastajúcou teplotou	17
Tabuľka 3: Počet kvasiniek v jednotlivých okienkach pre vzorku a i paralelnú vzorku b, a celkový počet kvasiniek v 1 ml	29
Tabuľka 4: Počet kvasiniek v jednotlivých okienkach pre vzorku a i paralelnú vzorku b, a celkový počet kvasiniek v 1 ml	30
Tabuľka 5: Počet kvasiniek v jednotlivých okienkach pre vzorku a i paralelnú vzorku b, a celkový počet kvasiniek v 1 ml	31
Tabuľka 6: Jednotlivé koncentrácie živých a mŕtvych kvasiniek	33

9. CITOVANÁ LITERATÚRA

- [1] CHEN, Francis F. *Úvod do fyziky plazmatu*. 3. vyd. Praha: Academia, 1984, 328 s.
- [2] *Základy potravinárskych technológií: spracovanie rastlinných a živočíšnych surovín, cereálne a fermentačné technológie, uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 1996. ISBN 80-967-0641-1.
- [3] BARTH, Roger. *The chemistry of beer: the science in the suds*. 1.vydání. Hoboken: Wiley, 2013. ISBN 978-1-118-67497-0.
- [4] KOLLÁR, Anton. *Pivo: zdraví, souvislosti, žízeň, obezita, alkoholismus, kuriozity*. Vyd. 1. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 2012. ISBN 978-80-7204-795-6.
- [5] *Seznam států světa podle spotřeby piva na osobu* [online]. b.r. [cit. 2017-05-14]. Dostupné z:
[https://cs.wikipedia.org/wiki/Seznam_st%C3%A1t%C5%AF_sv%C4%Bta_podle_s
pot%C5%99eby_piva_na_osobu](https://cs.wikipedia.org/wiki/Seznam_st%C3%A1t%C5%AF_sv%C4%Bta_podle_spot%C5%99eby_piva_na_osobu)
- [6] *Litres of beer consumed per person per year (2002)* [online]. NationMaster.com 2003-2017, 2002 [cit. 2017-03-30]. Dostupné z:
[http://www.nationmaster.com/country-info/stats/Lifestyle/Food-and-
drink/Beer/Consumption](http://www.nationmaster.com/country-info/stats/Lifestyle/Food-and-drink/Beer/Consumption)
- [7] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH. *Procesy a zařízení v potravinářství a biotechnologiích*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2013. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-163-4.
- [8] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [9] HUDECOVÁ, Daniela a Viktor MAJTÁN. *Mikrobiológia I*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo STU, 2002. Edícia skrípt. ISBN 80-227-1663-4.
- [10] GÖRNER, Fridrich. a Ľubomír. VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívateľín: princípy mikrobiológie požívateľín, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívateľinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004. ISBN 80-967-0649-7.
- [11] WEBSTER, John a Roland WEBER. *Introduction to fungi*. 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 2007. ISBN 978-052-1014-830.
- [12] BURSOVÁ, Šárka, Marta DUŠKOVÁ, Lenka NECIDOVÁ, Renáta KARPÍŠKOVÁ, a Petra MYŠKOVÁ. *Mikrobiologické laboratorní metody*. 1.vyd. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno: Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-676-6.

- [13] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-708-0509-9.
- [14] VESELÁ, Mária. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. Vyd. 3. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2004. ISBN 80-214-2567-9.
- [15] *Benefits And Nutrition Of Agar Agar For Health And How To Use Agar Agar* [online]. 2015 [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <https://www.linkedin.com/pulse/benefits-nutrition-agar-health-how-use-hang-dang>
- [16] VESELÁ, Mária. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 2004. ISBN 80-214-2567-9.
- [17] MARTIŠOVITŠ, Viktor. *Základy fyziky plazmy: učebný text pre magisterské štúdium*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo UK, 2006. ISBN 80-223-1983-X.
- [18] GROSS, Boleslav. *Technika plazmatu*. 1.vydání. Brno: Rektorát VUT v Brně, 1985.
- [19] FITZPATRICK, R. *Introduction to Plasma Physics, a graduate level lecture course*. b.r.
- [20] AUBRECHT Vladimír. *Fyzika a diagnostika plazmatu*. 1.vyd. Fakulta elektrotechniky a komunikačných technológií: Vysoké učení technické, Brno
- [21] PEVNÝ, Antonín. *Štruktúra a vlastnosti skla*. b.r.
- [22] MEDVECKÁ, Veronika. *Aktivácia povrchu kremíkových substrátov nízкотеплотnou plazmou generovanou pri atmosférickom tlaku*. Fakulta matematiky, fyziky a informatiky Univerzity Komenského, Mlynská dolina, 842 48 Bratislava
- [23] *Úhel smáčení* [online]. b.r. [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/uhel_smaceni.html
- [24] SLÁMOVÁ, Jitka *Studium sterilizačních účinků dielektrického bariérového výboje*. Brno, 2013. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Doc. RNDr. František Krčma, Ph.D.